

Penentuan konsentrasi hambat minimal larutan irigasi chlorhexidine terhadap biofilm bakteri *Enterococcus faecalis*

by Ibnu Rusdiarto

Submission date: 08-Feb-2019 05:58PM (UTC+0800)

Submission ID: 1074938661

File name: CD-3-1-2013-01631-fp.pdf (154.84K)

Word count: 2061

Character count: 13059

Penentuan konsentrasi hambat minimal larutan irigasi *chlorhexidine* terhadap biofilm bakteri *Enterococcus faecalis*

(Determination of minimum inhibitory concentration of chlorhexidine irrigation solution toward biofilms of *Enterococcus faecalis* bacteria)

Ibnu Rusdiarto¹, Karlina Samadi², Dian Agustin Wahjuningrum²

¹Mahasiswa Strata -1 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

²Staf Pengajar Departemen Ilmu Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

ABSTRACT

Background. Root canal treatment is a procedure that performed to eliminate microorganisms in the root canal of the tooth with necrotic pulp. Microorganisms in a biofilm on the root canal led to the failure of root canal treatment. One of microorganisms that were able to form biofilms and cause failure of root canal treatment were the *Enterococcus faecalis* bacteria. The use of antimicrobial agents as a root canal irrigation were needed to eliminate microorganisms in the biofilms form. Chlorhexidine were an antimicrobial agent that is often used for root canal irrigation solution, cationic molecules of chlorhexidine would bind with a layer of extracellular polymeric matrix of biofilms that can inhibit the growth of bacteria in the biofilm. **Purpose.** The aim of this study is to know the minimum inhibitory concentration of chlorhexidine irrigation solution toward biofilm of *Enterococcus faecalis*. **Method.** This research was experimental laboratories in vitro research. The concentration of chlorhexidine solution were 2.5%; 1.25%; 0.625%; 0.3125%; 0.15625%. Biofilm formation was observed using the microtiter plate method, then continued by reading of Optical Density (OD) of biofilms using ELISA reader at a wavelength of 570 nm. **Result.** The percentage of biofilm OD exposed by concentration 2.5%; 1.25%; 0.625%; 0.3125%; 0.15625% of chlorhexidine solution in sequence were 6.59%; 8.98%; 11.24%; 13.07%; 15.17% from the positive control. **Conclusion.** Concentration 1.25% of chlorhexidine solution were the minimum inhibitory concentration of chlorhexidine irrigation solution toward biofilm of *Enterococcus faecalis* bacteria in vitro.

Key words : Biofilms, *Enterococcus faecalis*, chlorhexidine, extracellular polymeric matrix, cationic molecules.

Korespondensi (correspondence): Ibnu Rusdiarto, Pendidikan Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Jl. Mayjend Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya 60132, Indonesia. E-mail: ibnu092@gmail.com.

PENDAHULUAN

Perawatan saluran akar merupakan prosedur yang dilakukan untuk mengeliminasi mikroorganisme di dalam saluran akar. Ada tiga tahap dasar yang terdiri dari preparasi mekanis, irigasi dan disinfeksi, serta obturasi. Preparasi mekanis harus selalu diikuti dengan irigasi saluran akar untuk membersihkan potongan jaringan pulpa, serpihan dentin, bakteri, debris dan jaringan nekrotik.^{1,2} *Chlorhexidine* yang umum digunakan untuk larutan irigasi dibuat dengan garam diglukonat ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_6H_{12}O_7$), karena garam memiliki stabilitas tinggi dan larut dalam air. *Chlorhexidine* menunjukkan sifat antibakteri, antijamur, dan antivirus yang baik.^{3,4}

Saluran akar dan jaringan periapikal yang mengalami infeksi merupakan media yang mendukung bagi bakteri untuk berkoloni menjadi

struktur biofilm.¹ Pembentukan biofilm merupakan salah satu mekanisme pertahanan bakteri. Sifat biofilm adalah meningkatkan resistensi komponen bakteri terhadap sistem pertahanan *host* dan antimikroba.⁵ *Enterococcus faecalis* adalah mikroorganisme persisten yang meskipun jumlahnya sedikit dari flora pada saluran akar yang mengalami nekrosis, tetapi berperan dalam menyebabkan peradangan yang persisten. *Enterococcus faecalis* dapat bertahan dalam kondisi yang tidak mendukung, seperti pada saluran akar dengan hanya sedikit nutrisi yang tersedia. Bentuk pertumbuhannya melalui pembentukan biofilm.⁶ Beberapa penelitian menunjukkan bahwa bakteri yang tumbuh di dalam biofilm bisa dua kali lipat sampai seribu kali lipat lebih tahan terhadap agen antimikroba dibandingkan bentuk planktonik dari bakteri yang sama.⁷ Hal tersebut menimbulkan suatu rumusan

masalah: Seberapa besar konsentrasi hambat minimal larutan irigasi saluran akar *chlorhexidine* terhadap biofilm bakteri *Enterococcus faecalis*? Tujuan penelitian untuk mengetahui konsentrasi hambat minimal larutan irigasi saluran akar *chlorhexidine* terhadap biofilm bakteri *Enterococcus faecalis*.

8

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris *in-vitro* dengan rancangan penelitian *post test only control group design* dengan sampel larutan *chlorhexidine* yang diencerkan menjadi berbagai konsentrasi menggunakan pengencer *aquadest*.

Alat yang digunakan; oese, brander spiritus, *anaerobic jar*, tabung reaksi, cawan petri, pipet, mikroskop, *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate*, dan ELISA reader. Bahan yang digunakan; media *Tryptone Soya Broth* (TSB), bakteri *Enterococcus faecalis*, larutan *chlorhexidine*, larutan *phosphate-buffered saline* (pH 7,3), *aquadest* steril, *crystal violet* 2%, HCl Isopropanol 200µl.

Larutan *chlorhexidine* yang digunakan didapatkan dari PT. Medichem yang diimpor dari Spanyol dengan konsentrasi 20%. Konsentrasi yang digunakan untuk penelitian ini adalah 2.5%; 1.25%, 0.625%; 0.3125%; 0.15625% yang didapatkan dengan penipisan seri. Bakteri *Enterococcus faecalis* yang digunakan didapatkan dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya.

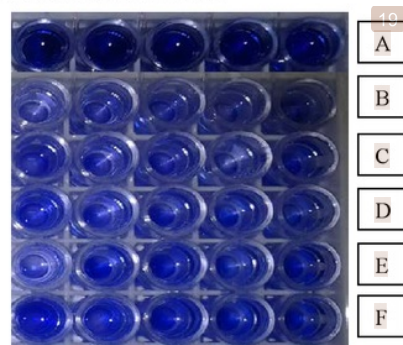
Pembentukan biofilm dan penentuan konsentrasi hambat minimal: bakteri *Enterococcus faecalis* yang telah dibiakkan pada TSB selama 24 jam didilusi sampai 1:100 pada TSBglu. Kemudian 0,1 ml bakteri *Enterococcus faecalis* dengan konsentrasi 10^6 bakteri/ml diisikan ke dalam *96-well flat bottomed plastic tissue culture plate* dan sebanyak 0,2 ml diisikan ke dalam *96-well flat bottomed plastic tissue culture plate* sebagai kontrol positif. Selanjutnya *96-well flat bottomed plastic tissue culture plate* biinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam larutan *chlorhexidine* sebanyak 1 ml diaplikasikan ke dalam masing-masing *well* dengan konsentrasi 2.5%; 1.25%, 0.625%; 0.3125%; 0.15625% kecuali kontrol positif, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian isi dari tiap *well* diaspirasi dan dicuci 3 kali dengan 0,2 ml *phosphate-buffered saline* (pH 7,3) dengan menggunakan pipet. Biofilm yang menempel pada *well* kemudian diberi pewarnaan dengan 0,2 ml *crystal violet* 2%. Selanjutnya dilakukan

pembilasan dengan *aquadest* steril dan dikeringkan. Untuk menganalisis pembentukan biofilm secara kuantitatif ditambahkan 0,2 ml HCl isopropanol sebagai larutan fiksasi pada setiap *well*. Kemudian dilakukan pengukuran *Optical density* (OD) menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 570nm. Prosedur ini diulang sebanyak 5 kali, kemudian dibuat rata-rata nilai OD dari setiap perlakuan.⁸

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif dari pembacaan pada ELISA reader berupa *Optical Density* (OD) pada setiap *well* yang diberi perlakuan berbeda, yaitu pemberian larutan *chlorhexidine* dengan konsentrasi 2.5%; 1.25%, 0.625%; 0.3125%; 0.15625% serta kontrol positif. Selanjutnya data dianalisis menggunakan program SPSS 13.0 untuk Windows.

HASIL

Hasil penelitian menunjukkan OD biofilm pada kelompok yang diberi perlakuan penambahan larutan *chlorhexidine* dengan konsentrasi 2.5%; 1.25%, 0.625%; 0.3125%; 0.15625% terjadi penurunan nilai OD biofilm secara bertahap dibanding kelompok kontrol. Dari hasil tersebut diketahui bahwa bakteri *Enterococcus faecalis* yang mampu membentuk biofilm akan dihambat oleh larutan *chlorhexidine*.



Gambar 1. Hasil pewarnaan dengan *crystal violet* pada biofilm bakteri *Enterococcus faecalis*.

Keterangan :

A. Kontrol positif pengulangan sebanyak 5 kali; B. Perlakuan dengan penambahan larutan *chlorhexidine* dengan konsentrasi 2.5% pengulangan sebanyak 5 kali; C. Perlakuan dengan penambahan larutan *chlorhexidine* dengan konsentrasi 1.25% pengulangan sebanyak 5 kali; D. Perlakuan dengan penambahan larutan *chlorhexidine* dengan konsentrasi 0.625% pengulangan sebanyak 5 kali; E. Perlakuan dengan penambahan larutan *chlorhexidine* dengan konsentrasi 0.3125% pengulangan sebanyak 5 kali; F. Perlakuan dengan penambahan larutan *chlorhexidine* dengan konsentrasi 0.15625% pengulangan sebanyak 5 kali.

Tabel 1. Nilai rerata *Optical Density* biofilm, standar deviasi, prosentase *Optical Density* biofilm dan jumlah sampel.

Kel	Nilai <i>Optical Density</i>			n
	\bar{x}	SD	%	
1	0.5968	0.048345	15.17%	5
2	0.5140	0.014000	13.07%	5
3	0.4420	0.042332	11.24%	5
4	0.3534	0.042606	8.98%	5
5	0.2594	0.044015	6.59%	5
6	3.9334	0.040185	100%	5

Keterangan :

Kelompok 1 : Kelompok penambahan larutan *chlorhexidine* konsentrasi 0.15625%

Kelompok 2 : Kelompok penambahan larutan *chlorhexidine* konsentrasi 0.3125%

Kelompok 3 : Kelompok penambahan larutan *chlorhexidine* konsentrasi 0.625%

Kelompok 4 : Kelompok penambahan larutan *chlorhexidine* konsentrasi 1.25%

Kelompok 5 : Kelompok penambahan larutan *chlorhexidine* konsentrasi 2.5%

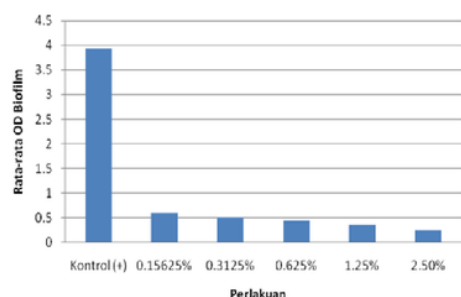
Kelompok 6 : Kelompok kontrol positif

\bar{x} : Rata-rata nilai *Optical Density*

SD : Standar Deviasi

n : Jumlah sampel

Gambar 2. Grafik hasil pengukuran OD biofilm menggunakan ELISA reader



Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa larutan *chlorhexidine* mampu menghambat pertumbuhan biofilm bakteri *Enterococcus faecalis* mulai dari konsentrasi 0.15625% (Tabel 1). Konsentrasi hambat minimal larutan *chlorhexidine* didapatkan pada konsentrasi 1.25% dengan prosentase OD biofilm bakteri *Enterococcus faecalis* sebesar 8.98%.

Dari uji statistik *Kolmogorov-Smirnov test* menunjukkan nilai probabilitas lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$), artinya data berdistribusi normal. Kemudian dilakukan uji homogenitas varians dengan *Levene's Test* didapatkan $p=0.348$, ini menunjukkan semua kelompok homogen ($p > 0,05$). Setelah diketahui semua kelompok

mempunyai distribusi normal dan homogen, maka untuk mengetahui adanya perbedaan nilai densitas optik *formazan* dilakukan uji *Oneway ANOVA* dan didapatkan hasil terdapat perbedaan bermakna pada nilai OD pada semua kelompok perlakuan dengan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

PEMBAHASAN

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok biofilm bakteri *Enterococcus faecalis* yang diberi perlakuan penambahan larutan *chlorhexidine* menunjukkan nilai *Optical Density* yang lebih kecil daripada nilai *Optical Density* kelompok biofilm yang tidak diberi perlakuan (kontrol positif), hasil ini menunjukkan bahwa *chlorhexidine* mampu mengeliminasi mikroorganisme dalam bentuk biofilm. Hal ini disebabkan bahwa *chlorhexidine* mengandung molekul-molekul bermuatan positif (molekul kationik) yang akan berinteraksi dengan lapisan ekstraseluler polimer matriks dari biofilm sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri dalam biofilm.

Chlorhexidine merupakan molekul bermuatan positif (molekul kationik) yang mampu berikatan dengan lapisan ekstraseluler polimer matriks (EPM) pada biofilm, ikatan tersebut dapat menyebabkan penyusutan biofilm dengan mekanisme mengubah sifat fisiko-kimia dari EPM tersebut yang meliputi; kelarutan, sifat hidrofobik dan muatan sepanjang rantai polimer. Perubahan pada muatan akan mempengaruhi struktur rantai EPM dan tingkat ikatan molekul yang berdekatan, hal ini memungkinkan perubahan struktur biofilm berupa pembukaan *water-channel* yang bisa membantu dalam difusi *chlorhexidine* ke lapisan yang lebih dalam, sehingga larutan *chlorhexidine* mampu untuk menembus EPM yang merupakan *barrier* bakteri yang berada di dalam biofilm.⁹ Setelah *chlorhexidine* berinteraksi dengan bakteri, molekul kationik cepat teradsorpsi ke permukaan sel bakteri yang bermuatan negatif. Molekul kationik *chlorhexidine* mengubah integritas dari lapisan luar sel, tetapi kerusakan ini tidak cukup untuk menimbulkan lisis atau kematian sel. Molekul *chlorhexidine* menembus membran luar dan mengikat kelompok fosfolipid pada bagian dalam membran. Hal ini akan mengakibatkan permeabilitas membran bagian dalam meningkat dan partikel dengan berat molekul rendah seperti kalium dan ion fosfor mengalami kebocoran. Pada tahap tersebut, *chlorhexidine* memiliki efek reversibel, oleh karena itu, dianggap bakteriostatik. Kenaikan konsentrasi *chlorhexidine* akan menyebabkan penurunan kebocoran, karena

koagulasi dan presipitasi molekul intraseluler terjadi di sitoplasma; akibatnya, perbaikan membran dan sitoplasma sel dihambat. Pengaruh *chlorhexidine* menjadi ireversibel, menunjukkan sifat bakterisidanya.³ Mekanisme kerja *chlorhexidine* dengan melepas molekul kationik akan menyebabkan gangguan terhadap membran *lipid-bilayer*. *Chlorhexidine* konsentrasi rendah akan terikat kuat pada area anionik membran sel. Interaksi tersebut dapat menurunkan fluiditas membran dan dapat mempengaruhi *osmoregulator* dan fungsi fisiologis dari membran sel yang kemudian dapat mempengaruhi perkembangan biofilm. Pada konsentrasi yang lebih tinggi, interaksi yang lebih berat dapat menyebabkan membran kehilangan integritas struktural dan memungkinkan kebocoran molekul-molekul intraseluler.¹⁰

Dengan demikian dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa larutan irigasi *chlorhexidine* mampu menghambat pertumbuhan biofilm bakteri *Enterococcus faecalis*. Konsentrasi hambat minimal larutan irigasi saluran akar *chlorhexidine* terhadap biofilm bakteri *Enterococcus faecalis* adalah 1.25%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Narayanan, L. L., Vaishnavi, C. *Endodontic Microbiology*. Journal of Conservative Dentistry, 2010; Oct-Dec, Vol 13.
2. Shahani, M. N., Subba Reddy, V. V. *Comparison of Antimicrobial Substantivity of Root Canal Irrigants in Instrumented Root Canals up to 72 h: An in vitro study*. Journal of the Indian Society of Pedodontics & Preventive Dentistry; 2011; Jan-Mar, Vol. 29 Issue 1, India: Bharati Vidhyapeeth University, Dental College and Hospital.
3. Sen, B. H., Turk, B. T. *An update on chlorhexidine in endodontics*. ENDO (Lond Engl) 2009; 3(2):87–99.
4. Hülsmann, M., Rödic, T., Normeyer, S. *Complications during Root Canal Irrigation*. Endodontic Topics, 2009;16, 27–63.
5. Gurenlian, J. R. *The Role of Dental Plaque Biofilm in Oral Health*. Journal of Dental Hygiene, 2007; Vol. 81, No. 5, October.
6. Pujar, M., Patil, C., Kadam, A. *Comparison of antimicrobial efficacy of Triphala, (GTP) Green tea polyphenols and 3% of sodium hypochlorite on Enterococcus faecalis biofilms formed on tooth substrate: in vitro*. JIOH 2011; Volume 3; Issue 2: April.
7. Mohammadi, Z., Abbott, P. V., *The properties and applications of chlorhexidine in endodontics*. International Endodontic Journal, 2008; 42, 288–302.
8. Stepanovic, S., et al. *A Modified Microtiter-Plate Test for Quantification of Staphylococcal Biofilm Formation*. Journal of Microbiology, 1999; 40.
9. Hope, C. K., Wilson, M. *An analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity*. Oral Health Care Sciences, 2004.
10. Houari, A., Di Martino, P. *Effect of Chlorhexidine and Benzalkonium Chloride on Bacterial Biofilm Formation*. The Society for Applied Microbiology, Universite de Cergy-Pontoise, 2007; 45.

Penentuan konsentrasi hambat minimal larutan irigasi chlorhexidine terhadap biofilm bakteri Enterococcus faecalis

ORIGINALITY REPORT

19%

SIMILARITY INDEX

15%

INTERNET SOURCES

12%

PUBLICATIONS

12%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

www.jpbums.info

Internet Source

2%

2

L.R. Rodrigues. "Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants", Journal of Applied Microbiology, 3/2006

Publication

2%

3

Submitted to University of Alabama at Birmingham

Student Paper

1%

4

repository.liv.ac.uk

Internet Source

1%

5

Submitted to University of Minnesota System

Student Paper

1%

6

Submitted to Royal College of Surgeons

Student Paper

1%

7

Submitted to International Academy

Student Paper

		1 %
8	dwi-setianingtyas.blogspot.com Internet Source	1 %
9	dent.unhas.ac.id Internet Source	1 %
10	www.scielo.br Internet Source	1 %
11	docslide.us Internet Source	1 %
12	sonda.sfzg.hr Internet Source	1 %
13	kim.ung.ac.id Internet Source	1 %
14	Springer Series on Biofilms, 2015. Publication	1 %
15	eprints.umm.ac.id Internet Source	1 %
16	www.dergipark.ulakbim.gov.tr Internet Source	1 %
17	Submitted to Universitas Pendidikan Indonesia Student Paper	<1 %
18	jurnal.ugm.ac.id Internet Source	<1 %

19	seztifam07.student.ipb.ac.id Internet Source	<1 %
20	eprints.ums.ac.id Internet Source	<1 %
21	www.nematodes.org Internet Source	<1 %
22	media.neliti.com Internet Source	<1 %
23	Aries Chandra Trilaksana, Adeliana Saraswati. "Efficacy of green tea leaf extract (Camellia sinensis) with NaOCl 2.5% againts Enterococcus faecalis as an alternative solution for root canal irrigation", Journal of Dentomaxillofacial Science, 2016 Publication	<1 %
24	www.ispcd.org Internet Source	<1 %
25	Endodontic Irrigation, 2015. Publication	<1 %
26	Safina Majdina, Dian Mulawarmanti, Yoifah Rizka. "Efektifitas Kombinasi Terapi Oksigen Hiperbarik dan Gel Teripang Emas (Stichopus hermanii) terhadap Peningkatan Jumlah Osteoblas pada Tikus Diabetes Melitus yang Diinduksi Bakteri Porphyromonas gingivalis",	<1 %

DENTA, 2016

Publication

Exclude quotes On

Exclude bibliography Off

Exclude matches < 5 words

Penentuan konsentrasi hambat minimal larutan irigasi chlorhexidine terhadap biofilm bakteri Enterococcus faecalis

GRADEMARK REPORT

FINAL GRADE

/100

GENERAL COMMENTS

Instructor

PAGE 1

PAGE 2

PAGE 3

PAGE 4